

文章编号:1000-5471(2011)01-0142-06

# 猪粪水培养絮凝剂产生菌的研究<sup>①</sup>

邵承斌<sup>1,2</sup>, 敖黎鑫<sup>1</sup>, 思显佩<sup>1</sup>, 汤敏<sup>3</sup>

1. 废油资源化技术与装备教育部工程研究中心, 重庆 400067;

2. 重庆工商大学环境与生物工程学院, 重庆 400067; 3. 重庆市綦江县环境保护局, 重庆 401420

**摘要:** 从活性污泥中筛选得到一株具有较高絮凝活性的絮凝剂产生的菌株 FH-8, 用猪粪水替代部分碳源、氮源, 优化了该絮凝剂产生菌的培养条件. 结果表明: 在猪场养殖粪水 COD 质量浓度为 1 000 mg/L 的 1 L 猪粪水中添加 4 g 葡萄糖、0.5 g(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 调节培养基初始 pH 值为 7、培养 48 h 后得到的菌悬液对高岭土絮凝活性达到 93.2%. 用猪粪水生产的微生物絮凝剂比传统培养基生产的微生物絮凝剂更为节约成本, 约为传统培养基成本的 20%.

**关键词:** 猪粪水; 微生物絮凝剂; 培养条件; 成本

**中图分类号:** Q939.97

**文献标志码:** A

微生物絮凝剂是微生物在特定培养条件下, 生长代谢到一定阶段产生的具有絮凝活性的代谢产物<sup>[1]</sup>, 因其具有高效、无毒、可生物降解等特点, 逐渐成为研究热点<sup>[2-5]</sup>, 但生产成本过高限制了其大规模应用. 因此, 优化培养条件, 寻找廉价的替代培养基是实现微生物絮凝剂工业化生产的必要条件<sup>[6-9]</sup>. 本研究利用猪场养殖粪水作为发酵培养基制备微生物絮凝剂, 通过单因子试验和正交试验设计优化得到了该菌株产生絮凝剂的最佳培养条件.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

菌种来源: 从重庆唐家桥污水处理厂活性污泥中分离获得.

猪粪水来源: 来自重庆工商大学养猪场, 为猪排泄物及猪场冲洗混合废水. 试验所取粪水中测得 COD 质量浓度为 1 000 mg/L; 总磷为 190 mg/L; 总氮为 5 mg/L.

仪器: 721 可见分光光度计、磁力搅拌机、恒温震荡培养箱、高压灭菌锅.

试剂: 牛肉膏, 蛋白胨, NaCl, 葡萄糖, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 琼脂, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Mg(SO<sub>4</sub>)·7H<sub>2</sub>O, 尿素, 酵母膏.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 絮凝剂产生菌的分离和筛选<sup>[10]</sup>

取污水处理厂的活性污泥, 富集培养后, 将菌液逐级稀释至原质量浓度的 10<sup>-1</sup>~10<sup>-7</sup> 倍, 平板划线, 37 °C 培养 1~2 d, 挑取生长旺盛, 表面黏稠的单个菌落, 斜面划线培养 1~2 d, 测絮凝活性后, 选择高絮凝活性菌落, 继续用无菌水稀释, 多次划线分离, 直至经镜检确认为纯的单菌落, 同时测定絮凝活性, 絮凝

① 收稿日期: 2009-12-19

基金项目: 重庆市高校科技创新团队计划基金资助项目(KJTD201020).

作者简介: 邵承斌(1956-), 男, 四川巴中人, 研究员, 主要从事农业废弃物综合利用研究.

活性最高者获选, 命名为 FH-8.

### 1.2.2 絮凝剂样品制备

将菌种接入装有 50 mL 种子培养基(牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, H<sub>2</sub>O 1 L, pH 7.4)的 150 mL 三角瓶中培养, 在 30 ℃, 120 r/min 摇床转速下培养 24 h, 发酵液作为种子培养液. 然后按 10% 的相对接种量(V/V)将种子液接种至猪场养殖粪水发酵培养基中, 30 ℃, 120 r/min 摇床发酵培养 72 h 后, 发酵液在 5 000 r/min 下离心 20 min, 取上清液作为絮凝剂样品.

### 1.2.3 絮凝活性测定<sup>[11]</sup>

在 50 mL 烧杯中加入 0.2 g 高岭土, 1 mL 絮凝剂样品(发酵液), 1 mL 质量分数为 1% 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液, 最后加蒸馏水置 50 mL 总体积, 调节溶液的 pH 值为 7.0, 置于磁力搅拌机上搅拌, 控制条件为 200 r/min 下快搅 1 min, 然后 80 r/min 下慢搅 4 min; 静置 2 min, 取上清液于 721 型分光光度计 550 nm 处测定其吸光度, 同时以蒸馏水代替发酵液作对照, 以絮凝率表示絮凝活性. 絮凝率的计算公式为

$$E = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$$

式中:  $E$  为絮凝率;  $A_0$  为对照上清液 550 nm 处的吸光度;  $A$  为絮凝后上清液 550 nm 处的吸光度.

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种的筛选

经分离、纯化, 从活性污泥中共分离得到 200 个菌株, 通过初筛试验, 初步得到有絮凝活性的菌株 43 株, 再经复筛和传代培养, 测定絮凝率, 得到 6 株具有稳定高絮凝活性的微生物(表 1). 选其中絮凝性能最好的 FH-8 菌株进一步试验.

表 1 菌株的筛选结果

菌株	絮凝率/%	菌株	絮凝率/%	菌株	絮凝率/%
FH-8	89.10	XH-38	85.24	XH-59	70.74
FH-6	86.31	XH-8	88.64	FH-55	85.17

### 2.2 猪场养殖粪水质量浓度对絮凝效果的影响

猪场养殖粪水中含有大量的有机物, 其 COD 值约为 1 000 mg/L, 而不同质量浓度的粪水对絮凝效果的影响不同. 试验中将养殖粪水稀释成不同的质量浓度, 向 250 mL 三角瓶中加入 100 mL 不同质量浓度的养殖粪水, 高压蒸汽灭菌, 灭菌后用来培养微生物絮凝剂菌株 FH-8, 测定发酵液的絮凝活性(图 1).

由图 1 可知, 由于猪场养殖粪水中 COD 的质量浓度并不是很高, 所以质量浓度越小, 所产生的絮凝剂效果越差. 当 COD 值为 10 mg/L 时, 所产生的絮凝剂活性约为 0. 这是因为质量浓度过低, 稀释倍数过大, 导致废水中营养物质不足, 影响菌株 FH-8 的生长, 从而导致形成絮凝剂的能力降低. 随着质量浓度的增大, 废水中营养物质比较充足, 菌株生长良好, 絮凝能力也比较好的, 在 1 000 mg/L 时, 絮凝率达到 58.24%. 所以, 利用养殖废水作为菌株 FH-8 的培养基时, 其 COD 质量浓度应为 1 000 mg/L.

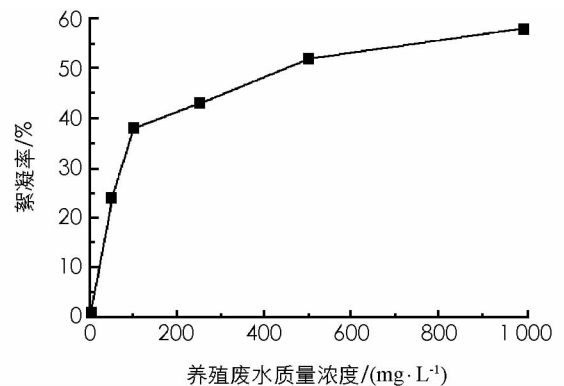


图 1 不同猪粪水质量浓度对絮凝活性的影响

### 2.3 不同种类碳源、氮源及无机盐对絮凝效果的影响

在猪场养殖粪水中, 分别加入不同的碳源、氮源或者无机盐, 测定菌株的絮凝率. 选择碳源时, 粪水中不加入氮源和无机盐; 选择氮源时, 粪水中不加入碳源和无机盐; 选择无机盐时, 粪水中不加入碳源和氮源(表 2).

表 2 碳源、氮源和无机盐的选择

碳源 (质量分数为 1%)	絮凝率 /%	氮源 (质量分数为 0.1%)	絮凝率 /%	无机盐 (质量分数为 0.05%)	絮凝率 /%
蔗糖	73.24	尿素	70.25	NaCl	59.21
葡萄糖	77.27	酵母膏	69.24	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	61.74
淀粉	68.81	硫酸铵	74.53	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	62.22
乳糖	71.94	蛋白胨	59.81	MgSO <sub>4</sub>	59.37
乙醇	65.25	NaNO <sub>3</sub>	69.63	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	60.65

由表 2 可知,猪场养殖粪水培养微生物絮凝菌株时,葡萄糖能为菌株的生长提供充足的碳源,其絮凝效果最好,达到 77.27%;它的发酵液更黏稠,停止搅拌后絮体沉淀的时间更短,絮凝体更加粗大.这可能是葡萄糖结构相对简单,可以直接被吸收利用,有利于细胞的代谢和产物的合成.另外,有研究表明某些菌株胞外多糖水解酶较少,故单糖比多糖更容易被利用<sup>[12]</sup>.在氮源方面,无机氮源对絮凝活性的效果略高于有机氮源,其中硫酸铵培养的絮凝剂的絮凝率达到了 74.53%;也即是硫酸铵对微生物絮凝剂的产生和细胞的繁殖最为有利.而无机盐对菌株絮凝效果影响最大的是 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,絮凝率为 62.22%,但与猪场养殖粪水不添加无机盐作培养基时相比较,添加无机盐对絮凝活性的促进作用并不明显,可能是因为猪场粪水中有培养微生物所需的无机盐.因此,在猪场养殖粪水培养微生物絮凝菌株 FH-8 时,可添加硫酸铵和葡萄糖作外加氮源和碳源,无需添加无机盐.

## 2.4 碳、氮添加量对絮凝活性的影响

在猪场养殖粪水中加入不同质量浓度的氮源、碳源,测其不同质量浓度对菌株合成絮凝剂的影响.测氮源时,加入 0.5,1,2,3,4,5 g/L 的硫酸铵测絮凝率;测碳源时,加入 0,1,2,4,6,8,10 g/L 的葡萄糖测絮凝率(图 2,3).

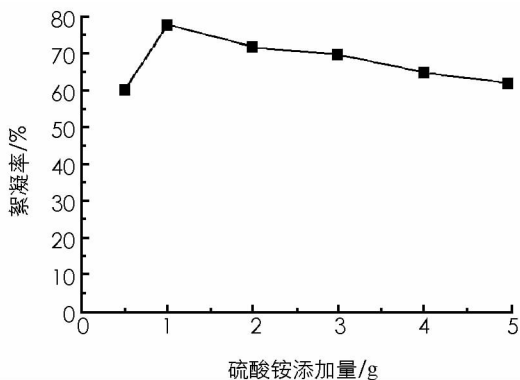


图 2 硫酸铵添加量对絮凝效果的影响

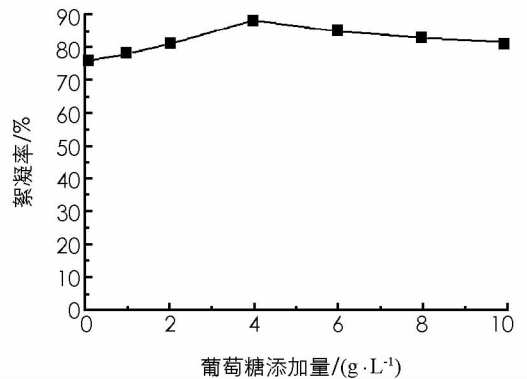


图 3 葡萄糖添加量对絮凝效果的影响

由图 2,3 可知,硫酸铵添加量为 1 g/L 时,絮凝率达到最大为 75.42%,絮凝沉淀的过程比猪场粪水原水培养的微生物絮凝剂快.葡萄糖添加量为 4 g/L 时,絮凝率为 88.34%,高岭土形成的絮体粗大,且在慢速搅拌的过程中就开始沉淀,即沉淀时间短.而过高或过低的葡萄糖质量浓度都不利于该菌株生长.这是由于糖质量浓度过低,不能提供足够的能量和物质来源.而葡萄糖质量浓度过高,一方面会引起发酵液中渗透压过高,使细胞失水,生长受到抑制;另一方面会引起代谢产生的葡萄糖酸增加,发酵液 pH 值降低,不利于菌株生长.因此,适宜的葡萄糖添加量为 4 g/L,硫酸铵添加量为 1 g/L.

## 2.5 培养基初始 pH 值对絮凝活性的影响

在 1 L 猪场养殖粪水发酵液中加入 4 g 葡萄糖和 1 g 硫酸铵,用 10% 的 NaOH 和 HCl 调整培养基的初始 pH 值为 4,5,6,7,8,9,10,发酵培养后测菌株 FH-8 的絮凝率(图 4).

由图 4 可知,pH 值从 4 到 6 时,絮凝率随 pH 值的增加而增加,当 pH 值为 6 时,絮凝率达到最大为 88.71%;而 pH 值在 6 到 10 范围时,絮凝率随 pH 值的增加而逐渐减小,说明培养基为弱酸时有利于微生物絮凝剂的产生.pH 值对微生物的生长和代谢具有很大的影响,太高或太低的 pH 值都不利于细菌的生长和絮凝剂的产生.一方面,pH 值过低或过高都会引起微生物表面电荷的改变,不利于细胞对营养物质的

吸收; 另一方面, pH 值的改变会让有机化合物离子化, 不利于有机化合物渗入细胞. 所以, 养殖废水培养基的最佳初始 pH 值为 6.

## 2.6 培养时间对絮凝活性的影响

向 1 L 养殖废水培养基中加入 4 g 葡萄糖、1 g 硫酸铵并调整初始 pH 值为 6、温度为 30 ℃、摇床转速为 150 r/min, 培养微生物絮凝菌株 FH-8. 在不同发酵时间下, 取样测定其絮凝率(图 5).

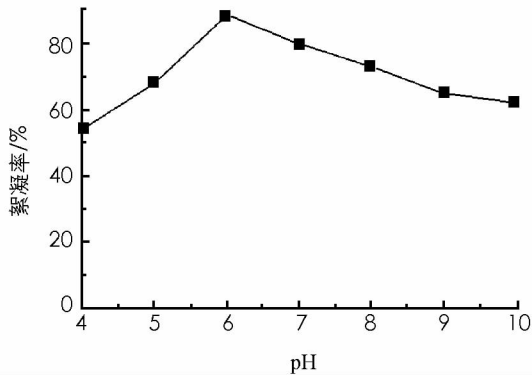


图 4 培养基初始 pH 值对絮凝活性的影响

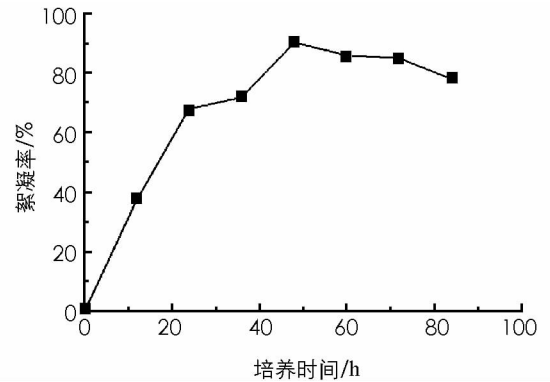


图 5 培养时间对絮凝效果的影响

由图 5 可知, 在 0~48 h 之间, 絮凝活性随着培养时间的延长而提高, 当培养 48 h 的时候, 絮凝活性达到最大, 为 90.32%; 在 48~72 h 之间为稳定期, 絮凝率维持在 80% 以上; 72 h 之后为衰减期, 絮凝率开始下降. 所以, 培养时间应选择稳定期的初始作为结束时间, 培养时间的选择为 48 h 比较适宜.

## 2.7 猪粪水培养絮凝菌株的正交优化试验

以絮凝率为控制指标, 试验安排选取  $L_{16}(4^5)$  正交试验表(表 3). 其中葡萄糖分别投加 3, 4, 5, 6 g; 硫酸铵分别投加 0.5, 1, 2, 3 g; pH 值分别为 5, 6, 7, 8; 培养时间分别为 36, 48, 60, 72 h; 粪水 COD 质量浓度分别为 700, 800, 900, 1 000 mg/L.

表 3 正交试验设计及试验结果

试验编号	A 葡萄糖 /g	B 硫酸铵 /g	C 培养基 初始 pH 值	D 培养时间 /h	E 粪水 COD 质量浓度 /(mg · L <sup>-1</sup> )	絮凝率 /%
1	3	0.5	5	36	700	74.51
2	3	1	6	48	800	81.34
3	3	2	7	60	900	79.35
4	3	3	8	72	1000	81.40
5	4	0.5	6	60	1000	91.73
6	4	1	5	72	900	83.35
7	4	2	8	36	800	79.65
8	4	3	7	48	700	87.22
9	5	0.5	7	72	800	79.25
10	5	1	8	60	700	75.52
11	5	2	5	48	1000	84.35
12	5	3	6	36	900	75.34
13	6	0.5	8	48	900	81.35
14	6	1	7	36	1000	85.20
15	6	2	6	72	700	76.68
16	6	3	5	60	800	68.55
$k_1$	79.150	81.710	77.690	78.675	78.483	
$k_2$	85.487	81.352	81.273	83.565	77.198	
$k_3$	78.615	80.007	82.755	78.787	79.847	
$k_4$	77.945	78.127	79.480	80.170	85.670	
极差	7.542	3.583	5.065	4.890	8.472	

从表 3 可知,各因素对絮凝效果的效应从大到小依次为猪场养殖粪水 COD 质量浓度、葡萄糖、培养基初始 pH 值、培养时间、硫酸铵,最佳培养条件为  $A_2B_1C_3D_2E_4$ ,即培养基中葡萄糖为 4 g、硫酸铵为 0.5 g、培养基初始 pH 值为 7、培养时间为 48 h、猪场养殖粪水 COD 质量浓度为 1 000 mg/L。在此最佳培养条件下进行验证,得到的菌液对高岭土悬液的絮凝活性高达 93.2%,优于正交试验表中的最大值。

## 2.8 成本核算

目前大多数培养基使用葡萄糖或蔗糖作为碳源,其用量大约为 10~20 g/L;酵母膏(0.5 g/L)、尿素(0.5 g/L)、蛋白胨(1 g/L)或硫酸铵作为氮源;磷源用  $K_2HOP_4$ (5 g/L)和  $KH_2OP_4$ (2 g/L)。而它们的大量投加是絮凝剂培养成本居高不下的主要原因。

按照大多数文献中使用的培养基,发酵生产微生物絮凝剂的成本是每吨液体絮凝剂粗品约为 110~150 元,其中碳源费用约占总成本的 2/3,酵母膏费用约占 1/4。本研究发明的猪粪水培养基大大节约了碳源、氮源的投加量,与文献相比,碳源的投加量节约了 60%~80%,使微生物絮凝剂的生产成本降低到了文献报道的 20%。而使用猪粪水培养出的微生物絮凝剂对高岭土悬液废水的絮凝率达到 90%以上,对猪粪水也有一定的絮凝效果。

## 3 结 论

为了降低絮凝菌株 FH-8 形成絮凝剂的生产成本,采用猪场养殖粪水作为替代培养基,成本约为传统培养基的 20%。通过单因素试验和正交试验设计优化得到该菌株产生絮凝剂的最佳培养条件。在 1 L 猪场养殖粪水中添加 4 g 葡萄糖作为外加碳源,0.5 g  $(NH_4)_2SO_4$  作为外加氮源,调节培养基初始 pH 值为 7,猪场养殖粪水 COD 质量浓度为 1 000 mg/L,培养 48 h 后测得菌株 FH-8 对高岭土悬液的絮凝率达到 93.2%;对猪粪水总有机碳的去除率达到 38.7%。因此,筛选的絮凝菌株 FH-8 能够利用猪场养殖粪水生产微生物絮凝剂,既可降低生物絮凝剂的生产成本,又能达到以废治废的目的。

## 参考文献:

- [1] 郑怀礼. 生物絮凝剂与絮凝技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 11.
- [2] GANESH K C, JOO H S, CHOI J W, et al. Purification and Characterization of an Extracellular Polysaccharide from *Haloalkalophilic bacillus* sp. I-450 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34(7/8): 673 - 681.
- [3] 朱富坤, 刘彬彬, 闫永胜, 等. 微生物絮凝剂 PF-2 的成分分析及絮凝机制研究 [J]. *环境污染与防治*, 2008, 30(2): 37 - 44.
- [4] 周 礼, 张永奎, 陈 晓. 一种高效微生物絮凝剂产生菌的筛选及培养基优化 [J]. *环境科学学报*, 2006, 26(4): 584 - 588.
- [5] WANG Shu-guang, GONG Wen-xin, LIU Xian-wei. Production of a Novel Bioflocculant by Culture of *Klebsiella mobilis* Using Dairy Wastewater [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 36(2): 81 - 86.
- [6] MA Fang, LI Shu-geng, JIN Wen-biao. Present Conditions & Trend of Studies on Microbial Flocculant [J]. *Industrial Water & Wastewater*, 2002, 33(1): 7 - 9.
- [7] 魏晓金, 李 静, 何绪文. 微生物絮凝剂的絮凝条件及焦化废水净化研究 [J]. *中国工程科学*, 2009, 11(2): 88 - 91.
- [8] 王曙光, 刘贤伟, 高宝玉, 等. 利用酱油酿造废水生产微生物絮凝剂及其性能研究 [J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(4): 574 - 576.
- [9] 鲍立宁, 洪桂云, 宋礼华. 絮凝剂产生菌培养条件的研究及在废水处理中的应用 [J]. *生物学杂志*, 2008, 25(3): 21 - 23, 56.
- [10] 敖黎鑫, 邵承斌, 卢 辉, 等. 微生物絮凝剂产生菌 HF-8 的筛选与培养条件优化 [J]. *重庆工商大学学报: 自然科学版*, 2009, 26(5): 451 - 456.

- [11] 陶 然, 杨朝晖, 曾光明, 等. 微生物絮凝剂产生菌的筛选、鉴定及其培养条件的优化研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(8): 76 – 81.
- [12] 程金平, 郑 敏, 张兰英. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及产絮凝剂的周期研究 [J]. 环境科学与技术, 2001, 2(3): 12 – 15.

## Pig Manure Water Culture of Flocculant-Producing Strains

SHAO Cheng-bin<sup>1,2</sup>, AO Li-xin<sup>1</sup>, SI Xian-pei<sup>1</sup>, TANG Min<sup>3</sup>

1. Waste Oil Recycling Technology and Equipment Engineering Research Center of the Ministry of Education, Chongqing 400067, China;

2. School of Environmental and Biological Engineering, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China;

3. Qijiang Environmental Protection Bureau, Chongqing 401420, China

**Abstract:** A high flocculating activity of the flocculant-producing strains FH-8 were screened from activated sludge. FH-8 could produce bioflocculant feeding on pig manure water, a cheap substituting culture medium. The effect of carbon source, nitrogen source, initial medium pH and cultivation time on the yield and activity of bioflocculant were studied. The optimal cultivation conditions were obtained: 4 g glucose, 0.5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> added to 1000 mL pig manure water. pH at 7 and cultivation time of 48 h. The produced bioflocculant possesses flocculating activity of 93.2%, and its cost is only about 20% of the traditional medium.

**Key words:** pig manure water; microbial flocculant; culture conditions; cost

责任编辑 夏 娟